

(11)Publication number : 08-239658

(43)Date of publication of application : 17.09.1996

(51)Int.Cl.

C09K 15/34
 C09B 61/00
 C09K 15/04
 C12P 23/00
 //(C12P 23/00
 C12R 1:01)

(21)Application number : 07-083103

(71)Applicant : RES INST FOR PROD DEV

(22)Date of filing : 03.03.1995

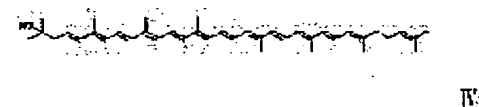
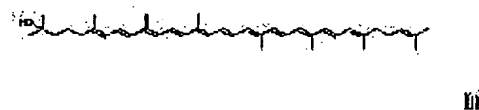
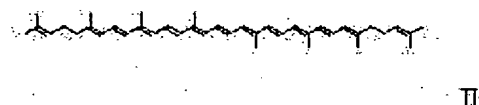
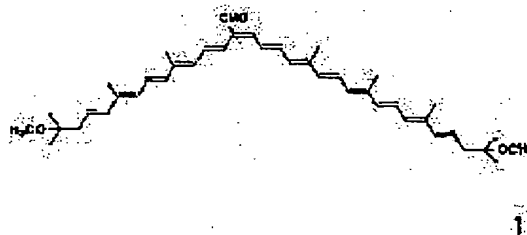
(72)Inventor : MAOKA TAKASHI
 MATSUMURA AKIHIKO
 ITO YOSHIHIRO
 OKUDA YOKO
 MOCHIDA KOICHI

(54) EXTRACT CONTAINING CAROTENOID HAVING ANTIOXIDATION ACTIVITY, ANTIOXIDANT, AND COLORANT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an excellent antioxidation activity by extracting bacteria, belonging to the genus Rhodobacter which can produce at least one of a new carotenoid 1, lycopene, rhodopine, and dehydrorhodopine represented by particular formulae, with an org. solvent.

CONSTITUTION: After cultivation in a predetermined medium, carotenoid producing bacteria, having an antioxidation activity, belonging to the genus Rhodobacter is extracted with an org. solvent, such as ethanol, acetone, or ethyl acetate, and the extract is concentrated under reduced pressure to give an extract having a red or purple color. The extract is then chromatographed on silica gel, and purple or red fractions are eluted with diethyl ether/n-hexane having concentrations of 40%, 5%, 30%, and 50%. The fractions thus eluted are purified by liq. chromatography using 20% dichloromethane/acetonitrile and concentrated under reduced pressure to give a new carotenoid 1 represented by the formula I, lycopene represented by the formula II, rhodopine represented by the formula III, and dehydrorhodopine represented by the formula IV.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.12.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 25.01.2005

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original
precisely.

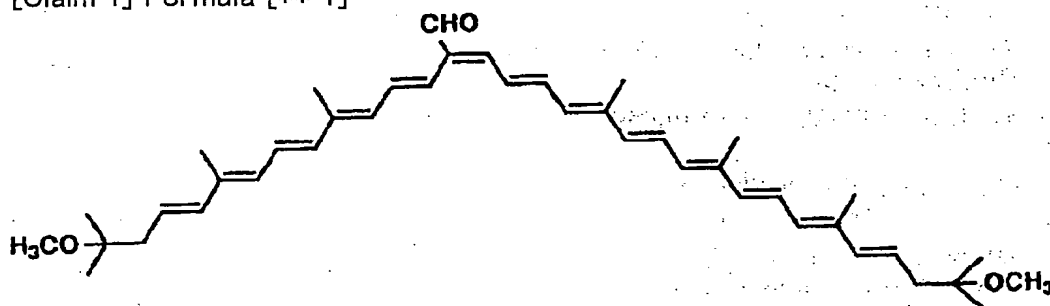
2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

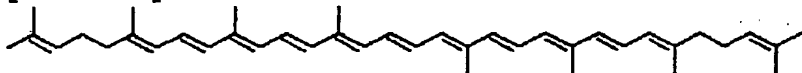
CLAIMS

[Claim(s)]

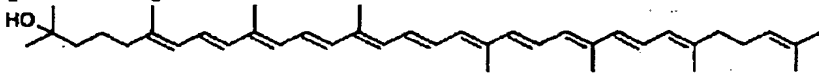
[Claim 1] Formula [** 1]



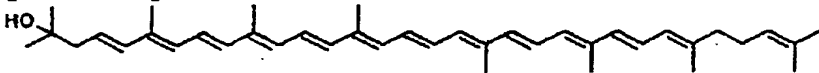
[Formula 2]



[Formula 3]



[Formula 4]



The anti-oxidant which comes to extract the bacteria belonging to the RODOBAKUTA group which produces one or more of the new carotinoid 1 (** 1) which comes out and has the antioxidation activity expressed, the lycopene (** 2), Lodopin (** 3), and DEHIDORO Lodopin (** 4) with an organic solvent.

[Claim 2] The carotinoid content extract with the antioxidation activity which comes to contain the new carotinoid 1 characterized by extracting the bacteria belonging to a RODOBAKUTA

group according to claim 1 using an organic solvent.

[Claim 3] The new carotinoid 1 with the antioxidation activity which comes to extract the bacteria belonging to a RODOBAKUTA group according to claim 1 using an organic solvent.

[Claim 4] Lycopene with the antioxidation activity which comes to extract the bacteria belonging to a RODOBAKUTA group according to claim 1 using an organic solvent.

[Claim 5] Lodopin with the antioxidation activity which comes to extract the bacteria belonging to a RODOBAKUTA group according to claim 1 using an organic solvent.

[Claim 6] DEHIDORO Lodopin with the antioxidation activity which comes to extract the bacteria belonging to a RODOBAKUTA group according to claim 1 using an organic solvent.

[Claim 7] The anti-oxidant which makes an active principle a carotinoid content extract according to claim 2.

[Claim 8] The anti-oxidant which makes an active principle the new carotinoid 1 according to claim 3.

[Claim 9] The anti-oxidant which makes the lycopene according to claim 4 an active principle.

[Claim 10] The anti-oxidant which makes Lodopin according to claim 5 an active principle.

[Claim 11] The anti-oxidant which makes an active principle DEHIDORO Lodopin according to claim 6.

[Claim 12] The coloring agent which consists of a carotinoid content extract with antioxidation activity according to claim 2.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the carotinoid (henceforth the new carotinoid 1) which is extracted from a carotinoid content extract and this carotinoid content extract with the antioxidation activity acquired from bacteria and which is expressed with ** 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin. Since the new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin have the outstanding antioxidation operation in a carotinoid content extract list with the antioxidation activity concerning this invention, they can be used for it as an anti-oxidant. Furthermore, since these extracts present a vivid red-purplish red color, they can be used as a coloring agent. Therefore, this invention can be widely used for each field, such as food, drugs, and cosmetics.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, marketing is presented with many antioxidants in order to prevent oxidation of food, drugs, cosmetics, or fats and oils. For example, a problem produces butylhydroxyanisole (BHA) and synthetic anti-oxidants, such as butyl hydroxyl toluene (BHT), from the field of the safety in the case of an activity, the rejection to a consumer's synthetic anti-oxidant is strong, and the actual condition is that the amount used is also decreasing.

[0003] And the peroxide generated by active oxygen in the living body becomes causes, such as aging of a cell, inflammation, and a ** gun. Therefore, the antioxidant of the natural origin with high safety is dramatically expected as matter which supports an antioxidation-defense mechanism in the living body in technical fields, such as drugs besides food especially health food, or protective foods, and cosmetics.

[0004] However, as for the anti-oxidant of the natural origin, the ascorbic acid, the tocopherol, etc. are used. In order to use the anti-oxidant of such the natural origin for food, drugs, cosmetics, etc. suitably, it is important to utilize on the conditions which find out the natural anti-oxidant with which properties differed, and demonstrate each description.

[0005] Moreover, as everyone knows, since safety is demanded, the need of the coloring agent of the natural origin with high safety is increasing especially the coloring agent used for food, cosmetics, etc.

[0006] Conventionally, various technical means to obtain the useful matter using a photosynthetic bacterium are proposed. For example, to JP,52-7079,B, namely, the Rhodopseudomonas (Rhodopseudomonas) group, The technique of obtaining the antiviral activity matter from a RODOSUPIRIUMU (Rhodospirillum) group and the Chromatium (Chromatium) group is indicated. Moreover, in JP,47-7954,B, it is Rhodopseudomonas. The technique of obtaining ubiquinone 50 from a KAPUSURATASU (Rhodopseu-domonas capsulatus: Fermentation Research Institute mycoparasite No. 879) biomass The technique of obtaining ubiquinone Q10 from this biomass is indicated by JP,56-34278,B.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although the need to a coloring agent is high in the anti-oxidant list of the natural origin with high safety in each field of food, drugs, and cosmetics as aforementioned, there are current and a trouble of being hard to construct the various formulas in the activity, by restricting dramatically the class of anti-oxidant of the natural origin currently used.

[0008] Moreover, there are many classes of coloring agent of the natural origin with high current and safety currently used, if it compares with the case of the above-mentioned anti-oxidant, but in order to make the color which is still rich in various change appear, they have the problem that there is a limitation.

[0009] In view of many above-mentioned troubles, a large quantity is carried out and, as for this invention, a new coloring agent offers the technical means which can be stabilized and supplied a technical technical problem at the new anti-oxidant list of the natural origin with high safety. In order to attain the above-mentioned technical problem, as a result of repeating systematic research and an experiment for many microorganisms and vegetation, this invention person etc. acquired the new knowledge which should be ** carried out of producing a carotinoid with the antioxidation activity excellent in the bacteria belonging to a RODOBAKUTA group, and completed this invention.

[0010]

[Means for Solving the Problem] This invention as follows can attain said technical technical problem.

[0011] namely, -- this invention -- RODOBAKUTA -- a group -- belonging -- the antioxidation -- activity -- having -- a carotinoid -- production -- a bacillus -- from -- an organic solvent -- using -- having extracted -- the antioxidation -- activity -- having -- a carotinoid -- content -- an extract -- RODOBAKUTA -- a group -- belonging -- the antioxidation -- activity -- having -- a carotinoid -- production -- a bacillus -- from -- an organic solvent -- using -- having extracted -- the antioxidation -- activity -- having -- a carotinoid -- content -- an extract -- an extract -- a source -- ** -- carrying out -- an organic solvent -- using -- having extracted -- new -- a carotinoid -- one -- the lycopene -- Lodopin -- and -- DEHIDORO -- Lodopin -- it is -- .

[0012] Moreover, this invention is an anti-oxidant which makes an active principle the above-mentioned carotinoid content extract, the new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin.

[0013] Moreover, this invention is a coloring agent which consists of a carotinoid content extract

with the above-mentioned antioxidation activity.

[0014] Moreover, this invention cultivates a carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to a RODOBAKUTA group. The organic solvent chosen from a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone extracts this biomass. A carotinoid content extract with the antioxidation activity which consists of condensing this extract, A carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to a RODOBAKUTA group is cultivated. The organic solvent chosen from a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone extracts this biomass. The lycopene which consists of condensing this extract and condensing the red fraction which carries out fractionation of this concentrate with a silica gel chromatography, and is eluted in 5% diethylether and n-hexane, A carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to a RODOBAKUTA group is cultivated. The organic solvent chosen from a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone extracts this biomass. Lodopin which consists of condensing this extract and condensing the red fraction which carries out fractionation of this concentrate with a silica gel chromatography, and is eluted in 30% diethylether and n-hexane, A carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to a RODOBAKUTA group is cultivated. The organic solvent chosen from a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone extracts this biomass. A carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to the new carotinoid 1 and RODOBAKUTA group which consist of condensing this extract and condensing the purple fraction which carries out fractionation of this concentrate with a silica gel chromatography, and is eluted in 40% diethylether and n-hexane is cultivated. The organic solvent chosen from a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone extracts this biomass. It is DEHIDORO Lodopin which consists of condensing this extract and condensing the red fraction which carries out fractionation of this concentrate with a silica gel chromatography, and is eluted in 50% diethylether and n-hexane.

[0015] The example of a carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to the RODOBAKUTA group in each above-mentioned invention is RODOBAKUTA. It is KAPUSHURATASU (*Rhodobacter capsulatus*:ATCC11166).

[0016] Next, the configuration of this invention is explained in more detail. The carotinoid production bacillus with the antioxidation activity belonging to the RODOBAKUTA group used in this invention can perform mass culture easily by well-known cultivation (for example, the above refer to JP,47-7954,B). For example, YPS culture medium If it cultivates under an optical exposure for 30 degrees C and about 48 hours using [the culture medium (pH7.4) which consists of 2 0.03% of CaCl(s), and water 0.3% of yeast extracts, poly peptone 0.3%, and MgSO4.7H2O 0.05%], the bacteria of a large quantity can be cultivated easily. What is necessary is just to perform the harvest of the cultivated bacteria, and washing according to a conventional method.

[0017] As an extracting solvent for obtaining a carotinoid content extract with antioxidation activity from a biomass, organic solvents, such as a methanol, ethanol, ethyl acetate, or an acetone, can be used. In addition, when a biomass is extracted with water, antioxidation activity is not accepted in a water extract fraction.

[0018] The concentration and the fractionation means itself which hits obtaining the new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin from the above-mentioned carotinoid content extract extracted from the biomass For example, although what is necessary is just to follow a conventional method using a column chromatography The new carotinoid 1 the purple FERA cushion eluted in 40% diethylether and n-hexane by the silica gel chromatography The lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin are obtained by condensing the fraction of the red eluted in 5% diethylether and n-hexane, 30% diethylether and n-hexane, and 50% diethylether and n-hexane, respectively.

[0019] The new carotinoid 1 An ultraviolet-visible-region absorption (UV-VIS) spectrum ([drawing 1](#)), An electron impact mass spectrum (EI-MS) ([drawing 2](#)), With a hydrogen nuclear-magnetic-resonance spectrum (1 H-NMR) ([drawing 3](#)) and a two-dimensional NMR spectrum ([drawing 4](#)) It is 13-cis- about the structure. - 1, 1'-dimethoxy -3, 4,3', 4'-tetrahydro - 1, 2, 1', 2'-tetrahydro - It was decided that it would be a gamma and gamma-carotene-20-R [an IUPAC nomenclature].

[0020] The main physical-properties values of the new carotinoid 1 are shown below. UV-VIS

(ether) 331, 386, 514 nm, EI-MS m/z 610.4438 ($[M]^+$ C₄₂H₅₈O₃, for 610.4433), 584, 479, 440, 386, 73, 1 H-NMR δ 1.16 (12H, s) (CDCl₃), 1.94 (6H, s), 2.02 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.33 (4H, 7.5), 5.75 (15H, dt, 7.5), 5.76 (15H, dt, 7.5), 6.13 (2H, 11), 6.17 (2H, 15), 6.22 (1H, 11), 6.26 (1H, 11), 6.35 (1H, dm, 11), 6.37 (2H, 15), 6.42 (1H, 15), 6.55 (1H, 15.5), 6.67 (5H, dd, 15, 11), 6.82 (5H, dd, 15, 11), 6.89 (1H, m), 7.09 (1H, m), 9.56 (1H, 2)

[0021] UV-VIS, EI-MS, and 1 H-NMR spectrum performed identification of the lycopene concerning this invention, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin.

[0022] The main physical-properties values of the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin are shown below. Lycopene UV-VIS (ether) 430, 469, and 499, EI-MS m/z 536 ($[M]^+$ C₄₀H₅₆), 1H-NMR(CDCl₃) δ -- 1.62 (6H, 2) and 1.69 (6H, s) -- 1.82 (6H, s), 1.97 (12H, s), 2.12 (8H, 7.5), 5.12 (2H, m), 5.95 (2H, 11), 6.18 (2H, 11), 6.25 (4H, 15), 6.35 (2H, 15), 6.49 (15H, dd, 11), 6.65 (2H, m)

[0023] Lodopin UV-VIS (ether) 430, 469, and 499, EI-MS m/z 554 ($[M]^+$, C₄₀H₅₈O), 1H-NMR (CDCl₃) δ -- 1.23 (6H, s) and 1.50 (4H, m) -- 1.62 (3H, 1.5), 1.69 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.96 (12H, s), 2.12 (6H, m), 5.11 (1H, m), 5.95 (1H, 11), 6.04 (1H, 11), 6.18 (1H, 11), 6.23 (4H, m), 6.25 (2H, 15), 6.35 (2H, 15), 6.49 (15H, dd, 11), 6.63 (2H, m)

[0024] DEHIDORO Lodopin UV-VIS (ether) 453, 480, and 513, EI-MS m/z 552 ($[M]^+$, C₄₀H₅₆O), 1H-NMR(CDCl₃) δ 1.23 (6H, s), 1.62 (3H, 2), 1.69 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.97 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.12 (2H, 7.5), 2.31 (2H, 7.5), 5.12 (1H, m), 5.75 (15H, dt, 7.5), 5.95 (1H, 11), 6.04 (1H, 11), 6.13 (1H, 11), 6.18 (1H, 11), 6.21 (1H, 15), 6.23 (2H, m), 6.25 (1H, 15), 6.35 (1H, 15.5), 6.38 (1H, 15.5), 6.49 (5H, dd, 15, 11), 6.60 (5H, dd, 15, 11), 6.63 (2H, m)

[0025] A carotinoid content extract with the antioxidation activity concerning this invention, the new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin can be used as an anti-oxidant according to the same activity gestalt as the case where an ascorbic acid and a tocopherol are used.

[0026] Moreover, the carotinoid content extract with the antioxidation activity concerning this invention can be used as a coloring agent according to the same activity gestalt as the case where the coloring agents (for example, a paprika pigment, Carrots oil, etc.) of the natural origin are used.

[0027] The new carotinoid 1 with the antioxidation activity concerning this invention, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin show an antioxidation operation stronger than beta carotene.

[0028] Moreover, the carotinoid content extract with the antioxidation activity concerning this invention is presenting clear red - a purplish red color, and has tinting strength equivalent to the coloring agent of the natural origin.

[0029]

[Example] It will be as follows if an example explains the configuration of this invention, and an operation concretely.

(Bacterial culture) By the YPS culture medium [0.3% of yeast extracts, poly peptone 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, 2 0.03% of CaCl(s), pH7.4], under the optical exposure, after cultivating for 48 hours, 9500 rpm, at-long-intervals alignment separation was carried out for 10 minutes, and 5 degrees C of 30 degrees C of biomasses were collected.

[0030] (Separation of an antioxidation active substance) RODOBAKUTA A room temperature extracts 60g of biomasses of KAPUSHURATASU twice by acetone 5000ml. After filtering an extract, vacuum concentration was carried out at 37 degrees C, and 10g of red crude extract was obtained. It drew to n-hexane with the with a diameter die length [30cm die length of 3cm] silica gel column chromatography, and this extract extract was drawn an eluted part to the precision with the diethylether mixed solvent. After the high performance chromatography by the dichloromethane acetonitrile refined the red fraction eluted in 5% diethylether and n-hexane 20% by making an OKUTA dodecyl silane into a stationary phase, vacuum concentration was carried out at 37 degrees C, and 9mg of red matter was obtained. The red matter obtained here has been identified the lycopene from the analysis result of UV-VIS, EI-MS, and 1 H-NMR spectrum. After the high performance chromatography by the dichloromethane acetonitrile refined the red fraction eluted in 30% diethylether and n-hexane 20% by making an OKUTA dodecyl silane into a

stationary phase, vacuum concentration was carried out at 37 degrees C, and 20mg of red matter was obtained. The red matter obtained here has been identified Lodopin from the analysis result of UV-VIS, EI-MS, and 1 H-NMR spectrum. After the high performance chromatography by the dichloromethane acetonitrile refined the red fraction eluted in 40% diethylether and n-hexane 20% by making an OKUTA dodecyl silane into a stationary phase, vacuum concentration was carried out at 37 degrees C, and 5mg of purple matter was obtained. The red matter obtained here is 13-cis- at a new carotinoid about the analysis result of UV-VIS, EI-MS, and 1 H-NMR spectrum to the structure. - They are 1, 1'-dimethoxy -3, 4.3', and 4'-tetrahydro. - They are 1, 2, 1', and 2'-tetrahydro. - It was decided that it would be a gamma and gamma-carotene-20-R. After the high performance chromatography by the dichloromethane acetonitrile refined the red fraction eluted in the 50% diethylether .n-hexane 20% by making an OKUTA dodecyl silane into a stationary phase, vacuum concentration was carried out at 37 degrees C, and 20mg of red matter was obtained. The red matter obtained here has been identified DEHIDORO Lodopin from the analysis result of UV-VIS, EI-MS, and 1 H-NMR spectrum. [0031] (Assay of antioxidation activity)

A. By lipophilicity azo compound AMVN:2 and 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile) In 1ml of n-hexane-2-propanol (1:1) v/v solutions of the depressant action (peroxidation depressant action of lipid by lipid peroxy radical LOO-) 0.1M methyl linoleate of the peroxidation reaction of the methyl linoleate guided, 100mM(s) 0.1ml of n-hexane solutions of AMVN is added, and it incubates under protection from light, obtaining with ** and carrying out at 37 degrees C, -- with time, 10micro of this reaction solution I was taken, and the content of methyl linoleate hydroperoxide was measured with the high speed liquid chromatography (control plot). On the other hand, after adding the matter which authorizes antioxidative activity beforehand in the n-hexane-2-propanol (1:1) v/v solution of 0.1M methyl linoleate and incubating for 5 minutes in it, AMVN was added, it incubated, the content of methyl linoleate hydroperoxide was similarly measured with the high speed liquid chromatography, and peroxidation depressant action was authorized as compared with the control plot. The depressant action of the peroxidation reaction in 700microM of the new carotinoid 1, 175microM, 87microM, and 43microM (the last concentration of a specimen material [in / in concentration / the above-mentioned system of reaction]) was shown in (drawing 5). The new carotinoid 1 controlled the peroxidation reaction on the concentration dependence target. Generation of a peroxide was not accepted in 700 moremicroM. The depressant action of the new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, DEHIDORO Lodopin, and the above-mentioned peroxidation reaction of 150micro (the last concentration of a specimen material [in / in concentration / the above-mentioned system of reaction]) of each M of beta carotene was shown in (drawing 6). The new carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin controlled this peroxidation reaction for all strongly. The peroxide generation ratios in each experimental plot which made 100% the control plot [/ in reaction initiation 60 minutes] are beta carotene (45%), the new carotinoid 1 (10%), the lycopene (10%), Lodopin (8%), and DEHIDORO Lodopin (9%), and are RODOBAKUTA. That the carotinoid obtained from KAPUSHURATASU has the antioxidation activity over a lipid peroxy radical four to 5 times compared with beta carotene became whether to be **.

[0032] B. Depressant action of the peroxidation reaction of the methyl linoleate guided by the photochemical reaction of a methylene blue (peroxidation prevention operation by singlet oxygen)

2ml of ethanol solutions of 0.1mM methylene BURE was added to 2ml of n-hexane-2-propanol (1:1) v/v solutions of 0.1M methyl linoleate, and the fluorescent light was irradiated. With time, 10micro of this reaction solution I was taken, and, therefore, the content of methyl linoleate hydroperoxide was measured to the high speed liquid chromatography (control plot). on the other hand, the matter which authorizes antioxidative activity beforehand was added to 2ml of n-hexane-2-propanol (1:1) v/v solutions of 0.1M methyl linoleate, after carrying out by having obtained with ** and dissolving, 2ml of ethanol solutions of a 0.1mM methylene blue was added, and the fluorescent light was irradiated. Therefore, the content of methyl linoleate hydroperoxide was similarly measured to the high speed liquid chromatography, and peroxidation depressant action was authorized as compared with the control plot. The depressant action of the new

carotinoid 1, the lycopene, Lodopin, DEHIDORO Lodopin, and the peroxidation reaction of 75micro (the last concentration of a specimen material [in / in concentration / the above-mentioned system of reaction]) of each M of beta carotene was shown in (drawing 7). The new carotinoid 1 and lycopene which it is in ** and to solve, Lodopin, and DEHIDORO Lodopin controlled this peroxidation reaction for all strongly also from (drawing 7).

[0033]

[Tinting-strength trial] The tinting-strength trial as follows was performed using the extract extract of the clear purplish red color obtained here. When extract extract 0.5mg of a purplish red color was dissolved in ether 2ml, this solution showed the color tone of 5R5/10 with the Munsell chromaticity. When the above-mentioned solution was air-dried after ***** in the white filter paper, this filter paper was dyed the color tone of 5R5/10-5R5/8 in the Munsell chromaticity. Most decoloring was not accepted even if it rinsed this filter paper. Next, after dissolving extract extract 0.5mg of a purplish red color in ether ethanol (1:1) 2ml, in addition to 10ml of Tween20 (trade name: surfactant) water solutions, it stirred 0.5%, and when this solution was added to 40ml of purified water, this purified water was further colored the color tone of 5R5/10-5R5/8 with the Munsell chromaticity. the tinting strength in which the extract extract obtained here was excellent from the above test result -- **** -- it can check that it is.

[0034]

[Effect of the Invention] According to this invention, the new anti-oxidant list in which safety has the antioxidation activity which was excellent in the high natural origin can be provided with a new coloring agent as shown also in the example. And the new anti-oxidant offered by this invention Of course, since it can also be used combining the various anti-oxidants of the existing natural origin, that it can be used independently It becomes possible to construct the various formulas according to each object, such as food, drugs, and cosmetics. Moreover, of course, since it can also be used combining the various coloring agents of the existing natural origin, it becomes possible to make the color which is rich in various change appear of the ability to also use independently the new coloring agent offered by this invention. Moreover, since mass culture can perform easily the biomass used for this invention by low cost, it can obtain each specified substance comparatively cheaply. Therefore, it can be said that the industrial availability of this invention is very large.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The ultraviolet-visible-region absorption (UV-VIS) spectrum of the new carotinoid 1 concerning this invention.

[Drawing 2] The electron impact mass spectrum of the new carotinoid 1 concerning this invention.

[Drawing 3] The hydrogen nuclear-magnetic-resonance spectrum of the new carotinoid 1 concerning this invention (1 H-NMR).

[Drawing 4] The two-dimensional NMR spectrum of the new carotinoid 1 concerning this invention.

[Drawing 5] The graph which shows the depressant action to the peroxidation reaction of the methyl linoleate guided by the lipophilicity radical generating agent AMVN.

[Drawing 6] The graph which shows the depressant action to the peroxidation reaction of the methyl linoleate guided by the lipophilicity radical generating agent AMVN.

[Drawing 7] The graph which shows the depressant action to the peroxidation reaction of the methyl linoleate by the singlet oxygen guided by the photochemical reaction of a methylene blue.

[Description of Notations]

Nothing.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

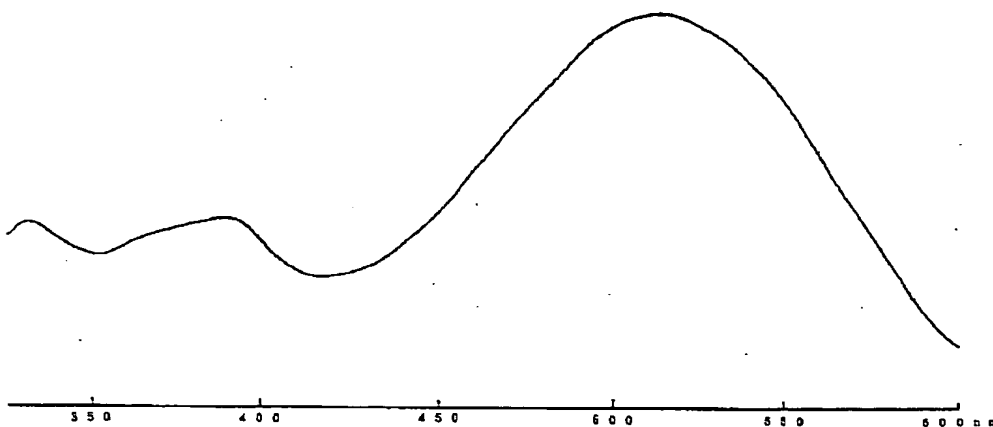
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

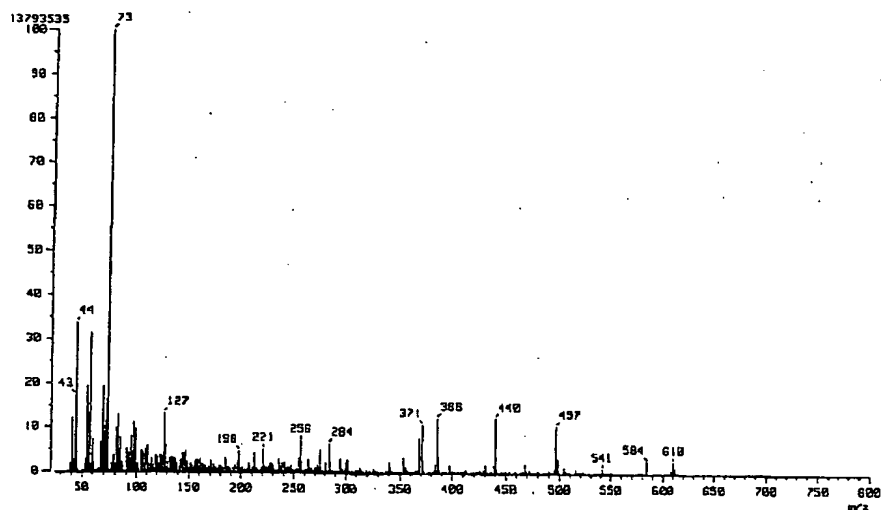
DRAWINGS

[Drawing 1]



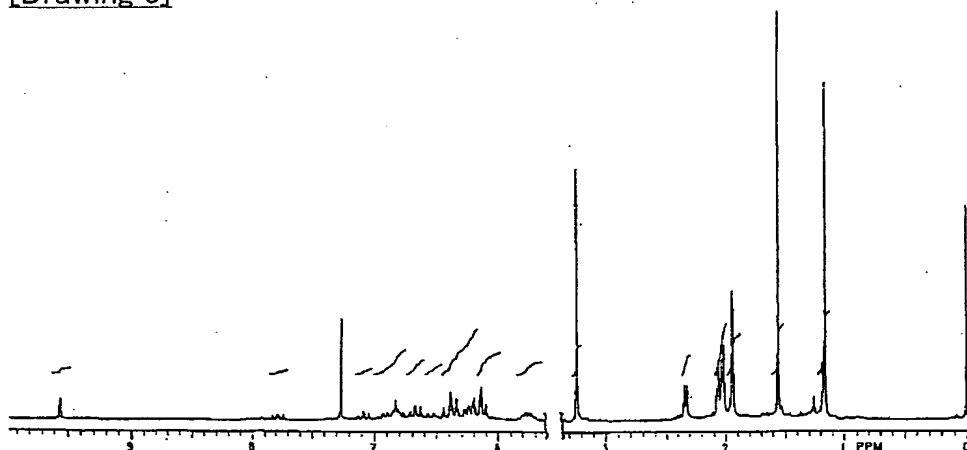
新規カロチノイド1の紫外-可視部吸収 (UV-VIS) スペクトル

[Drawing 2]

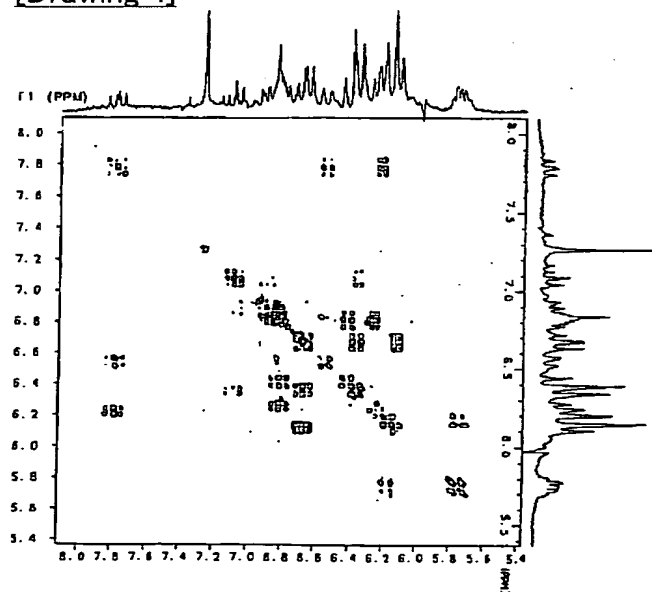


新規クロチノイド1のエレクトロインパクトマススペクトル

[Drawing 3]

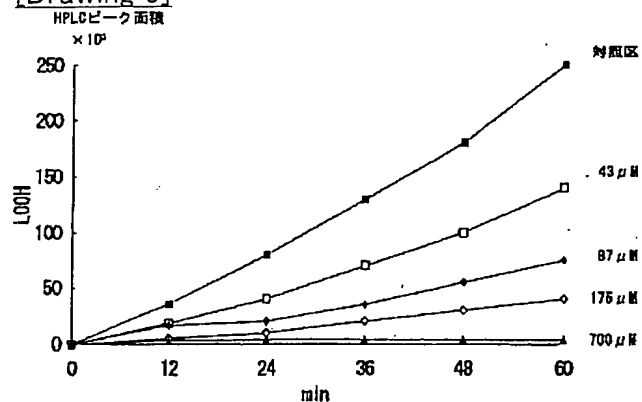
新規クロチノイド1の水素核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR)

[Drawing 4]



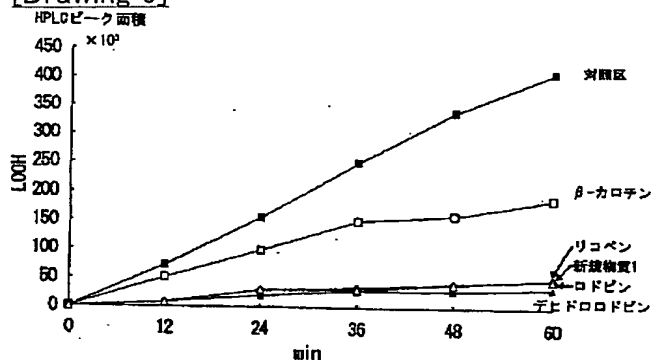
新規クロチノイド1の2次元NMRスペクトル

[Drawing 5]



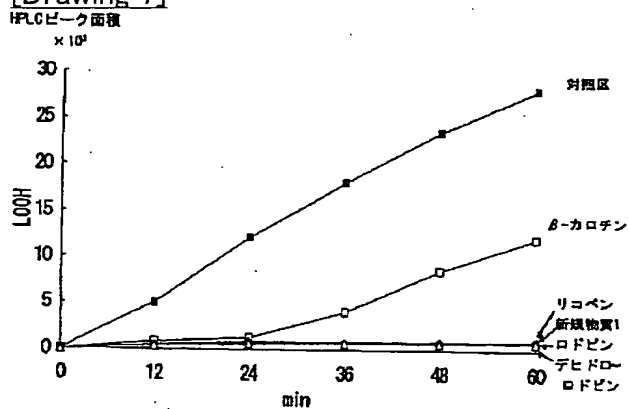
AMVNIによるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

[Drawing 6]



AMVNIによるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

[Drawing 7]



一重項酸素によるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-239658

(43) 公開日 平成8年(1996)9月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 9 K 15/34			C 0 9 K 15/34	
C 0 9 B 61/00			C 0 9 B 61/00	A
C 0 9 K 15/04			C 0 9 K 15/04	
C 1 2 P 23/00			C 1 2 P 23/00	
// (C 1 2 P 23/00				

審査請求 未請求 請求項の数12 書面 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-83103

(22) 出願日 平成7年(1995)3月3日

(71) 出願人 000002336

財団法人生産開発科学研究所

京都府京都市左京区下鴨森本町15番地

(72) 発明者 眞岡 孝至

滋賀県甲賀郡甲南町大字磯尾455番地

(72) 発明者 松村 昭彦

東京都港区白金2丁目5番51-301号

(72) 発明者 伊藤 義博

京都府京都市左京区高野竹屋町37-3 エースライフ洛北304号

(72) 発明者 奥田 葉子

兵庫県宝塚市伊子志2丁目9-9

(72) 発明者 持田 晃一

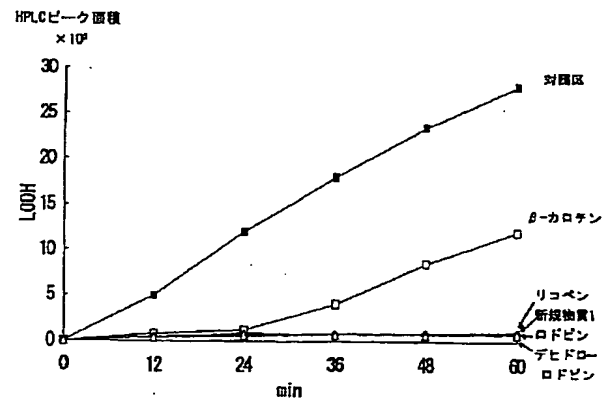
大阪府寝屋川市東香里園町8-10

(54) 【発明の名称】 抗酸化作用をもつカロチノイド含有エキス、抗酸化剤並びに着色料

(57) 【要約】

【目的】 食品、医薬品、化粧品に好適な安全性が高い天然由来の優れた抗酸化活性をもつ新規抗酸化剤並びに安全性が高い天然由来の鮮明な赤-赤紫色を呈する新規着色料を提供する。

【構成】 ロドバクター属に属し新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン、デヒドロロドピンを生産する菌(具体例 ロドバクター カプシュラタス *Rhodobacter capsulatus*: ATCC11166) から抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンを得る。



一重項酸素によるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

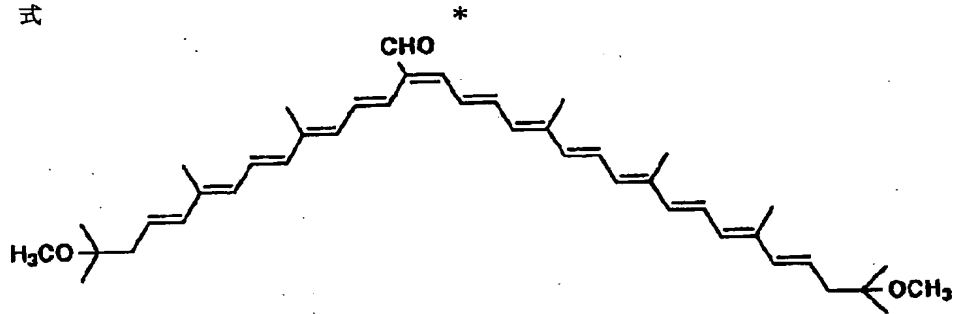
1

2

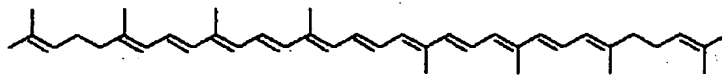
【特許請求の範囲】

【請求項1】 式

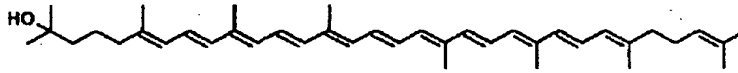
* 【化1】



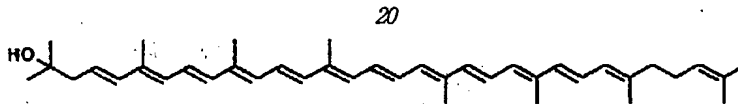
【化2】



【化3】



【化4】



で表される、抗酸化活性をもつ新規カロチノイド1（化1）、リコペン（化2）、ロドピン（化3）及びデヒドロロドピン（化4）のうちの一つ以上を産生するロドバクター属に属する細菌を有機溶媒で抽出してなる抗酸化剤。

【請求項2】 請求項1記載のロドバクター属に属する細菌を有機溶媒を用いて抽出したことを特徴とする、新規カロチノイド1を含有してなる抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス。

【請求項3】 請求項1記載のロドバクター属に属する細菌を有機溶媒を用いて抽出してなる抗酸化活性をもつ新規カロチノイド1。

【請求項4】 請求項1記載のロドバクター属に属する細菌を有機溶媒を用いて抽出してなる抗酸化活性をもつリコペン。

【請求項5】 請求項1記載のロドバクター属に属する細菌を有機溶媒を用いて抽出してなる抗酸化活性をもつロドピン。

【請求項6】 請求項1記載のロドバクター属に属する細菌を有機溶媒を用いて抽出してなる抗酸化活性をもつデヒドロロドピン。

【請求項7】 請求項2記載のカロチノイド含有エキスを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項8】 請求項3記載の新規カロチノイド1を有効成分とする抗酸化剤。

【請求項9】 請求項4記載のリコペンを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項10】 請求項5記載のロドピンを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項11】 請求項6記載のデヒドロロドピンを有効成分とする抗酸化剤。

【請求項12】 請求項2記載の抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスからなる着色料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細菌から得られる抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、該カロチノイド含有エキスより抽出される、化1で表されるカロチノイド（以下新規カロチノイド1という）、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンに関する。本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス並びに、新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンはその優れた抗酸化作用を有することから抗酸化剤として用いることができる。さらにこれらのエキスは鮮やかな赤色-赤紫色を呈するため着色料として用いることができる。従って、本発明は、食品、医薬品、化粧品などの各分野に広く利用できるものである。

【0002】

【従来の技術と問題点】 従来より、食品、医薬品、化粧品或いは油脂などの酸化を防止するため酸化防止剤が数多く市販に供されている。例えば、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）や、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）などの合成抗酸化剤は、その安全性の面から使用の際に問題が生じ、消費者の合成抗酸化剤に対する

拒否反応が強く、その使用量も減少しているのが現状である。

【0003】しかも、活性酸素により生体内に生成する過酸化物は細胞の老化、炎症、発ガンなどの原因になる。従って、安全性の高い、天然由来の抗酸化物質は、生体内における抗酸化的な防御機構を支援する物質として、食品、特に健康食品や栄養食品のほか、医薬品や化粧品などの技術分野において、非常に期待されている。

【0004】しかしながら、天然由来の抗酸化剤はアスコルビン酸、トコフェロールなどが使用されているにすぎない。こうした天然由来の抗酸化剤を食品、医薬品、化粧品などに適宜使用するためには、性質の異なった天然抗酸化剤を見だし、それぞれの特徴を発揮する条件で活用することが重要である。

【0005】また、周知の通り、食品、化粧品等に用いられる着色料は、特に安全性が要求されているので、安全性が高い天然由来の着色料の需要が増加している。

【0006】従来より、光合成細菌を用いて有用物質を得る様々な技術手段が提案されている。即ち、例えば、特公昭52-7079号公報にはロドシュウドモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドスピリウム (*Rhodospirillum*) 属及びクロマチウム (*Chromatium*) 属から抗ウイルス活性物質を得る技術が開示されており、また、特公昭47-7954号公報にはロドシュウドモナス カプスラタス (*Rhodopseudomonas capsulatus*: 微工研菌寄第879号) 菌体からユビキノン50を得る技術が、特公昭56-34278号公報には同菌体よりユビキノンQ10を得る技術が開示されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】前記の通り、食品、医薬品、化粧品の各分野においては、安全性が高い天然由来の抗酸化剤並びに着色料への需要が高いが、現在、実用されている天然由来の抗酸化剤の種類は非常に限られたものであり、その使用に当たって、多岐にわたる処方がかみ難いという問題点がある。

【0008】また、現在、実用されている安全性が高い天然由来の着色料の種類は、上記抗酸化剤の場合に比較すれば多いが、それでも多様な変化に富む色彩を現出させるには、限界があるという問題がある。

【0009】本発明は、上記諸問題点に鑑み、安全性が高い天然由来の新規抗酸化剤並びに新規着色料が大量且つ安定して供給できる技術手段の提供を技術的課題とする。本発明者等は、上記課題を達成するために、数多くの微生物、植物を対象として系統的な研究、実験を重ねた結果、ロドバクター属に属する細菌が優れた抗酸化活性を持つカロチノイドを産生するという刮目すべき新知見を得、本発明を完成したのである。

【0010】

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、次の通りの本発明によって達成できる。

【0011】即ち、本発明は、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌から有機溶媒を用いて抽出した抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを抽出源として有機溶媒を用いて抽出した新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンである。

【0012】また、本発明は、上記カロチノイド含有エキス、新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンを有効成分とする抗酸化剤である。

【0013】また、本発明は、上記抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスからなる着色料である。

【0014】また、本発明は、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮することからなる抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキス、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して5%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することからなるリコペン、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して30%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することからなるロドピン、ロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して40%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する紫色フラクションを濃縮することからなる新規カロチノイド1及びロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌を培養し、該菌体をメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンから選ばれる有機溶媒で抽出し、該抽出液を濃縮し、該濃縮物をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画して50%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色フラクションを濃縮することからなるデヒドロロドピンである。

【0015】上記各発明におけるロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌の具体例は、ロドバクター カプシュラタス (*Rhodobacter capsulatus*: ATCC11166) であ

る。

【0016】次に、本発明の構成を更に詳しく説明する。本発明において用いるロドバクター属に属する抗酸化活性をもつカロチノイド生産菌は、周知の培養法（例えば、前出特公昭47-7954号公報参照）によって、容易に大量培養が行える。例えばYPS培地〔酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 $CaCl_2$ 0.03%及び水からなる培地（pH7.4）〕を用い、30℃、約48時間、光照射下で培養すれば、容易に大量の細菌が培養できる。培養した細菌の集菌、洗浄は常法に従って行えばよい。

【0017】菌体から抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスを取得するための抽出溶媒としてはメタノール、エタノール、酢酸エチル又はアセトンなどの有機溶媒を用いることができる。なお、菌体を水で抽出した場合、水抽出画分には抗酸化活性は認められない。

【0018】菌体から抽出した上記カロチノイド含有エキスから新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンを得るに当たっての濃縮・分画手段自体は、例えば、カラムクロマトグラフィーを用いて、常法に従えばよいが、新規カロチノイド1はシリカゲルクロマトグラフィーによる40%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する紫色フラクションを、リコペン、ロドピン、デヒドロロドピンはそれぞれ5%ジエチルエーテル・n-ヘキサン、30%ジエチルエーテル・n-ヘキサン、50%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出する赤色のフラクションを濃縮することによって得られる。

【0019】新規カロチノイド1は紫外-可視部吸収（UV-VIS）スペクトル（図1）、エレクトロニンパクトマススペクトル（EI-MS）（図2）、水素核磁気共鳴スペクトル（ 1H -NMR）（図3）及び2次元NMRスペクトル（図4）によりその構造を13-シス-1, 1'-ジメトキシ-3, 4, 3', 4'-テトラデヒドロ-1, 2, 1', 2'-テトラハイドロ- γ , γ -カロテン-20-アール〔IUPAC命名法〕と決定した。

【0020】以下に新規カロチノイド1の主な物性値を示す。UV-VIS (ether) 331, 386, 514 nm, EI-MS m/z 610.4438 ($[M]^+$, $C_{42}H_{58}O_3$, for 610.4433), 584, 479, 440, 386, 73, 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 1.16 (12H, s), 1.94 (6H, s), 2.02 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.33 (4H, d, 7.5), 5.75 (1H, dt, 15, 7.5), 5.76 (1H, dt, 15, 7.5), 6.13 (2H, d, 11), 6.17 (2H, d, 15), 6.22 (1H, d, 11), 6.26 (1H, d, 1

1), 6.35 (1H, dm, 11), 6.37 (2H, d, 15), 6.42 (1H, d, 15), 6.55 (1H, d, 15.5), 6.67 (2H, dd, 15.5, 11), 6.82 (1H, dd, 15.5, 11), 6.89 (1H, m), 7.09 (1H, m), 9.56 (1H, d, 2)。

【0021】本発明に係るリコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンの同定はUV-VIS、EI-MS及び 1H -NMRスペクトルによって行った。

【0022】リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンの主な物性値を以下に示す。リコペンUV-VIS (ether) 430, 469, 499, EI-MS m/z 536 ($[M]^+$, $C_{40}H_{56}$), 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 1.62 (6H, d, 2), 1.69 (6H, s), 1.82 (6H, s), 1.97 (12H, s), 2.12 (8H, d, 7.5), 5.12 (2H, m), 5.95 (2H, d, 11), 6.18 (2H, d, 11), 6.25 (4H, d, 15), 6.35 (2H, d, 15), 6.49 (4H, dd, 15, 11), 6.65 (2H, m)。

【0023】ロドピンUV-VIS (ether) 430, 469, 499, EI-MS m/z 554 ($[M]^+$, $C_{40}H_{58}O$), 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 1.23 (6H, s), 1.50 (4H, m), 1.62 (3H, d, 1.5), 1.69 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.96 (12H, s), 2.12 (6H, m), 5.11 (1H, m), 5.95 (1H, d, 11), 6.04 (1H, d, 11), 6.18 (1H, d, 11), 6.23 (4H, m), 6.25 (2H, d, 15), 6.35 (2H, d, 15), 6.49 (2H, dd, 15, 11), 6.63 (2H, m)。

【0024】デヒドロロドピンUV-VIS (ether) 453, 480, 513, EI-MS m/z 552 ($[M]^+$, $C_{40}H_{56}O$), 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 1.23 (6H, s), 1.62 (3H, d, 2), 1.69 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.93 (3H, s), 1.97 (9H, s), 1.98 (3H, s), 2.12 (2H, d, 7.5), 2.31 (2H, d, 7.5), 5.12 (1H, m), 5.75 (1H, dt, 15, 7.5), 5.95 (1H, d, 11), 6.04 (1H, d, 11), 6.13 (1H, d, 11), 6.18 (1H, d, 11), 6.21 (1H, d, 15), 6.23 (2H, m), 6.25 (1H, d, 15), 6.35 (1H, d, 15.5), 6.38 (1H, d, 15.5), 6.49 (2H, dd, 15.5, 11), 6.60 (2H, dd, 15.5, 11), 6.63 (2H, m)。

【0025】本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイ

7

ド含有エキス、新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンは、アスコルビン酸やトコフェロールを用いる場合と同様の使用形態によって、抗酸化剤として用いることができる。

【0026】また、本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスは、天然由来の着色料（例えば、パブリカ色素やキャロットオイルなど）を用いる場合と同様の使用形態によって、着色料として用いることができる。

【0027】本発明に係る抗酸化活性をもつ新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンはβ-カロチンより強い抗酸化作用を示す。

【0028】また、本発明に係る抗酸化活性をもつカロチノイド含有エキスは鮮明な赤色～赤紫色を呈しており、天然由来の着色料と同等の着色力をもっている。

【0029】

【実施例】実施例によって本発明の構成、作用を具体的に説明すれば、次の通りである。

（細菌の培養）YPS培地〔酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.3%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 $CaCl_2$ 0.03%、pH7.4〕で光照射下、30℃、48時間培養した後、9500rpm、5℃、10分間遠心分離して、菌体を集めた。

【0030】（抗酸化活性物質の分離）ロドバクターカプシュラタスの菌体60gをアセトン5000mlで2回室温で抽出する。抽出液をろ過した後、37℃で減圧濃縮し赤色の粗抽出エキス10gを得た。この抽出エキスを直径3cm長さ30cmのシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりn-ヘキサン、ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、オクタデシルシランを固定相として20%ジクロロメタン・アセトニトリルによる高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、37℃で減圧濃縮して赤色物質9mgを得た。ここに得た赤色物質はUV-VIS、EI-MSおよび¹H-NMRスペクトルの解析結果から、リコペンと同定できた。30%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、オクタデシルシランを固定相として20%ジクロロメタン・アセトニトリルによる高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、37℃で減圧濃縮して赤色物質20mgを得た。ここに得た赤色物質はUV-VIS、EI-MSおよび¹H-NMRスペクトルの解析結果から、ロドピンと同定できた。40%ジエチルエーテル・n-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、オクタデシルシランを固定相として20%ジクロロメタン・アセトニトリルによる高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、37℃で減圧濃縮して紫色物質5mgを得た。ここに得た赤色物質は新規カロチノイドでUV-VIS、EI-MSおよび¹H-NMRスペクトルの解析結果から

8

その構造を13-シス-1, 1'-ジメトキシ-3, 4, 3', 4'-テトラデヒドロ-1, 2, 1', 2'-テトラハイドロ-γ, γ-カロテン-20-オールと決定した。50%ジエチルエーテル、n-ヘキサンで溶出した赤色フラクションを、オクタデシルシランを固定相として20%ジクロロメタン・アセトニトリルによる高速液体クロマトグラフィーによって精製した後、37℃で減圧濃縮して赤色物質20mgを得た。ここに得た赤色物質はUV-VIS、EI-MSおよび¹H-NMRスペクトルの解析結果から、デヒドロロドピンと同定できた。

【0031】（抗酸化活性の検定）

A. 脂溶性アゾ化合物AMVN: 2, 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile) によって誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応の抑制作用（脂質ペルオキシラジカル $LOO\cdot$ による脂質の過酸化抑制作用）0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール（1:1）v/v溶液1mlに100mM AMVNのn-ヘキサン溶液0.1mlを加え遮光下、37℃で浸とうしながらインキュベートする。経時的に、この反応溶液10μlを取り、高速液体クロマトグラフィーによってリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した（対照区）。一方0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール（1:1）v/v溶液にあらかじめ抗酸化力を検定する物質を添加し5分間インキュベートした後、AMVNを加えインキュベートし、同様に高速液体クロマトグラフィーによりリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較し過酸化抑制作用を検定した。（図5）に新規カロチノイド1の700μM, 175μM, 87μM, 43μM（濃度は上記反応系に於ける被検物質の最終濃度）での過酸化反応の抑制作用を示した。新規カロチノイド1は濃度依存的に過酸化反応を抑制した。更に700μMでは過酸化物の生成を認めなかった。（図6）に新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン、デヒドロロドピン及びβ-カロチンのそれぞれ150μM（濃度は上記反応系に於ける被検物質の最終濃度）での上記過酸化反応の抑制作用を示した。新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンはいずれもこの過酸化反応を強く抑制した。反応開始60分に於ける対照区を100%としたそれぞれの試験区での過酸化物生成比は、β-カロチン（45%）、新規カロチノイド1（10%）、リコペン（10%）、ロドピン（8%）、デヒドロロドピン（9%）であり、ロドバクターカプシュラタスから得られたカロチノイドがβ-カロチンにくらべ4～5倍脂質ペルオキシラジカルに対する抗酸化活性を持つことが明かとなった。

【0032】B. メチレンブルーの光化学反応によって誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応の抑制作用（一重項酸素による過酸化防止作用）

0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール(1:1)v/v溶液2mlに0.1mMメチレンブルーのエタノール溶液2mlを加え蛍光灯を照射した。経時的に、この反応溶液10 μ lを取り、高速液体クロマトグラフィーによつてリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定した(対照区)。一方0.1Mリノール酸メチルのn-ヘキサン-2-プロパノール(1:1)v/v溶液2mlに、あらかじめ抗酸化力を検定する物質を加え浸とうし溶解した後、0.1mMメチレンブルーのエタノール溶液2mlを加え蛍光灯を照射した。同様に高速液体クロマトグラフィーによつてリノール酸メチルヒドロパーオキシドの含量を測定し、対照区と比較し過酸化抑制作用を検定した。(図7)に新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン、デヒドロロドピン及び β -カロチンのそれぞれ75 μ M(濃度は上記反応系に於ける被検物質の最終濃度)での過酸化反応の抑制作用を示した。(図7)からも明かなごとく、新規カロチノイド1、リコペン、ロドピン及びデヒドロロドピンは、いずれもこの過酸化反応を強く抑制した。

【0033】

【着色力試験】ここに得た鮮明な赤紫色の抽出エキスをを用いて、次の通りの着色力試験を行った。赤紫色の抽出エキス0.5mgをエーテル2mlに溶解したところ該溶液はマンセル色度で5R5/10の色調を示した。上記溶液を白色濾紙に浸込ませた後、風乾したところ、該濾紙はマンセル色度で5R5/10-5R5/8の色調に染まった。この濾紙を水洗しても色落ちは殆ど認められなかった。次に、赤紫色の抽出エキス0.5mgをエーテル・エタノール(1:1)2mlに溶解した後、0.5%Tween20(商品名:界面活性剤)水溶液10mlに加えて攪拌し、更に、この溶液を精製水40mlに加えたところ、該精製水はマンセル色度で5R5/10-5R5/8の色調に着色された。以上の試験結果から、ここに得た抽出エキスが、優れた着色力をもっていることが確認できる。

【0034】

【発明の効果】本発明によれば、実施例にも示した通り、安全性が高い天然由来の優れた抗酸化活性をもつ新規抗酸化剤並びに新規着色料が提供できる。そして、本発明によって提供される新規抗酸化剤は、単独で利用できることは勿論、既存の天然由来の各種抗酸化剤と組み合わせることもできるから、食品、医薬品、化粧品等の各対象物に応じた多岐にわたる処方とすることが可能となり、また本発明によって提供される新規着色料も、単独で利用できることは勿論、既存の天然由来の各種着色料と組み合わせることもできるから、多様な変化に富む色彩を現出させることが可能となる。また、本発明に用いる菌体は、大量培養が容易に低コストで行えるので、各目的物を比較的安価に得ることができる。従って、本発明の産業利用性は非常に大きいといえる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る新規カロチノイド1の紫外-可視部吸収(UV-VIS)スペクトル。

【図2】本発明に係る新規カロチノイド1の電子スピン共振スペクトル。

【図3】本発明に係る新規カロチノイド1の水素核磁気共鳴スペクトル($^1\text{H-NMR}$)。

【図4】本発明に係る新規カロチノイド1の2次元NMRスペクトル。

【図5】脂溶性ラジカル発生剤AMVNにより誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

【図6】脂溶性ラジカル発生剤AMVNにより誘導されるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

【図7】メチレンブルーの光化学反応により誘導される一重項酸素によるリノール酸メチルの過酸化反応に対する抑制作用を示すグラフ。

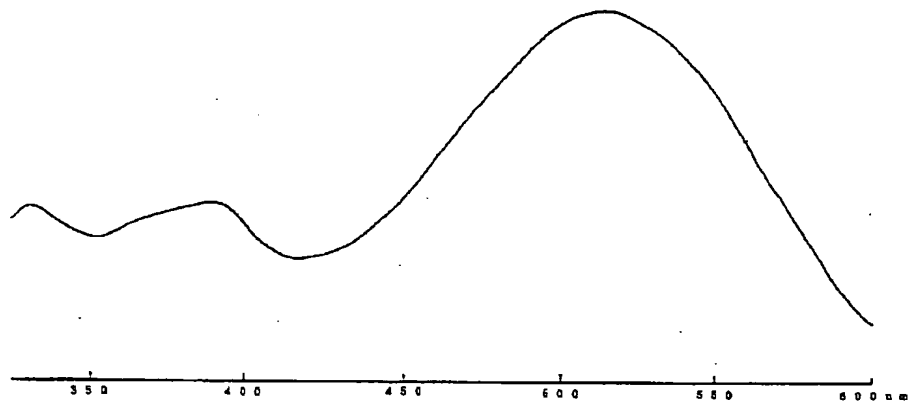
【符号の説明】

なし。

(7)

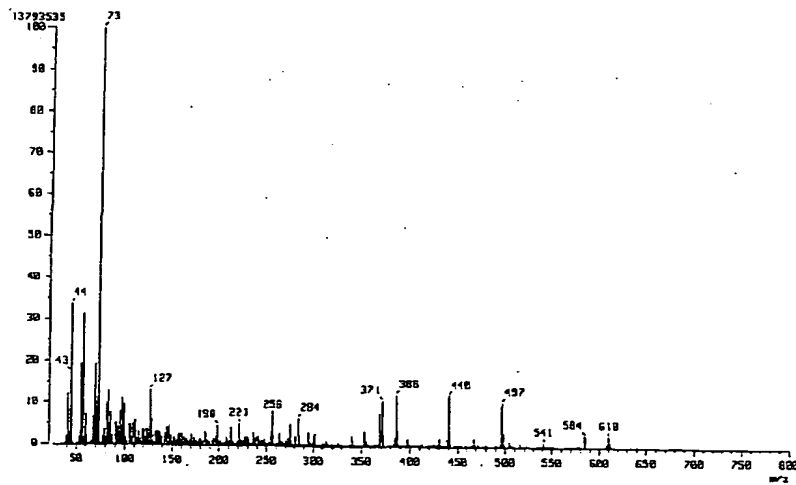
特開平8-239658

【図1】



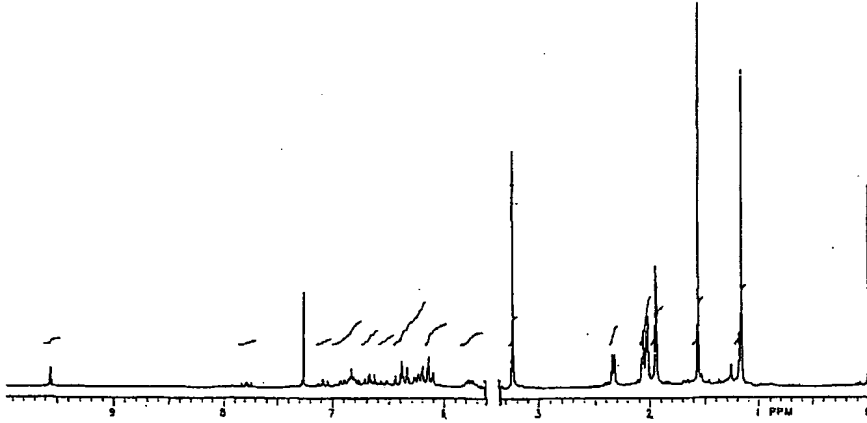
新規カロチノイド1の紫外-可視部吸収 (UV-VIS) スペクトル

【図2】

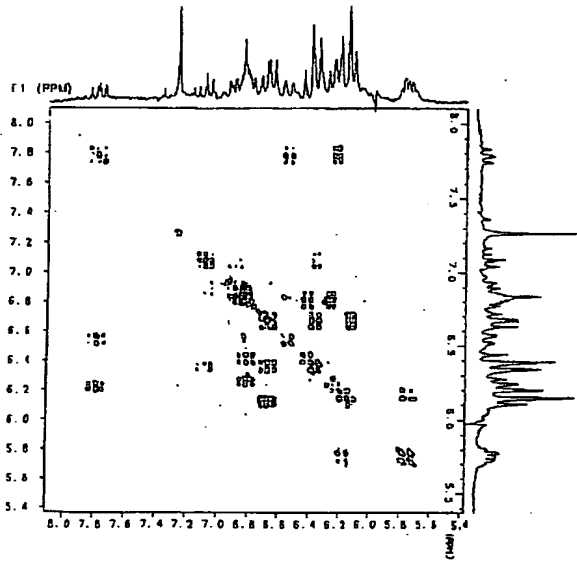


新規カロチノイド1のエレクトロインパクトマススペクトル

【図3】

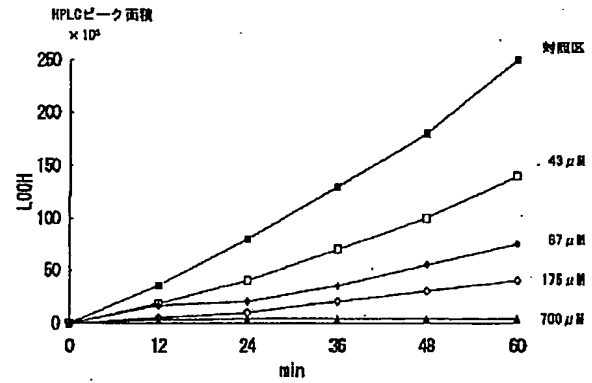
新規カロチノイド1の水素核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR)

【図4】



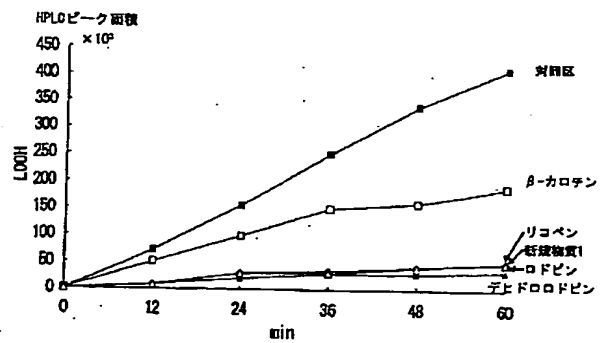
新規カロチノイド1の2次元NMRスペクトル

【図5】



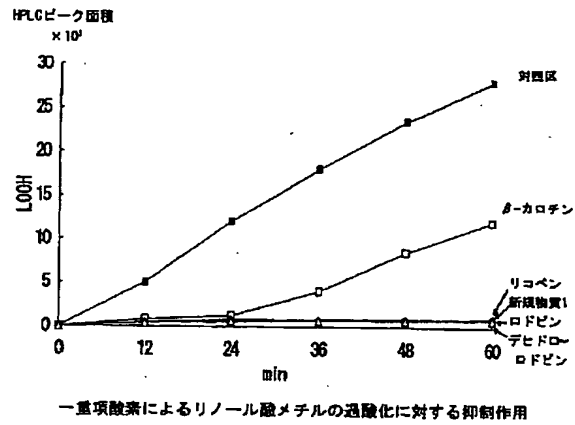
AMVHによるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

【図6】



AMVHによるリノール酸メチルの過酸化に対する抑制作用

【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12R 1:01)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所